# 大鼠肝细胞核纯化、染色质分部及染色质非组蛋白双向凝胶电泳分析

樊剑英　许以盛　胡　钧　杨瑞琨

（中国科学院昆明动物研究所）

李宝珪　仲金良　黄道培

（中国科学院上海生物化学研究所）

## 摘　要

本文使用改良的超离心法制备了大鼠肝细胞核，通过相差显微镜、电镜、转录活力及三种酶活力的测定，证实了所得细胞核较纯，其产率约为5%。使用羟基磷灰石（HAP）柱层析对染色质分部，并测定了各分部的紫外光谱。同时测定了核、染色质、染色质疏松结合非组蛋白（UP）、去up—染色质（UC）和HAP柱各分部的化学组成。对up和酚抽提法制得染色质紧密结合非组蛋白（NP）分别进行了双向凝胶电泳图谱分析。

## 前　言

染色质非组蛋白在真核基因表达的调控中起着重要的作用。其中染色质紧密结合非组蛋白在基因表达调控中的作用已引起人们的重视。

本文研究了细胞核的纯化、染色质非组蛋白制备和分部及各分部的化学组成分析和双向凝胶电泳分析等。这对基础研究将会有助于真核生物基因表达的调控研究。

本文1982年2月1日收到。

# 材料与方法

1.试剂：

苯甲基磺酸氟（PMSF）（上海生化所附属东风试剂厂）。苏糖醇（DTT）（上海生化所附属东风试剂厂）。羟基磷灰石（HAP）（本实验室制备）。牛血清白蛋白（经重结晶的）。小牛胸腺DNA（上海牛奶公司）。酵母tRNA（上海生化所附属东风试剂厂）。细胞色素C（上海生化所附属东风试剂厂）。胰岛素（上海生化所）。

2.动物：

雄性大白鼠。体重250克左右。实验前饥饿过夜。

3.细胞核制备：

我们参考Schütz法并加以改进。操作如下：

杀鼠、放血、取肝。肝经绞肉机绞碎，加5倍溶液A（0.25$M$蔗糖—5 m$M$ $MgCl_2$—10m$M$ Tris·HCl缓冲液pH8.0—0.1m$M$ PMSF），用Tefron头玻璃匀浆器匀浆，经二层尼龙布过滤，滤液经1000×g离心10分钟，沉淀悬浮于溶液B（2.2$M$蔗糖—5m$M$ $MgCl_2$—10m$M$ Tris·HCl缓冲液pH8.0—0.1m$M$ PMSF)，使蔗糖浓度最终达到1.7—1.8$M$，在离心管底部垫溶液B 15毫升，上层加45毫升蔗糖样品液，置冰浴充分冷却，在MSE 75Sw 23.5转头中平衡温度，55000×g（平均）离心50分钟。沉淀用溶液A低速离心洗涤一次得纯核，置-20°C以下贮存。使用前再经含1%Triton×—100溶液A洗涤一次。整个制备过程在冰浴中进行。

4.染色质分离：

采用Reeder法。将核于20倍体积12.5%甘油—1 m$M$ Yris·HCl缓冲液pH6.5—0.1m$M$ EDTA钠盐—0.1m$M$ PMSF—0.5m$M$ DTT)，置冰浴缓缓匀浆至核膜破，20000×g离心30分钟，沉淀为染色质。

5.染色质蛋白的分部：

按Chiu法进行。简述如下：

1.UP—染色质加10倍5 M尿素—50m$M$磷酸钠缓冲液pH7.6，置冰浴中用玻璃匀浆器匀浆后，冷室搅拌介离2小时，20000×g离心30分钟。上清液为UP，对水透析，再浓缩至1—2毫克/毫升，用作双向凝胶电泳样品。沉淀再加5倍5 $M$尿素—50m$M$磷酸钠缓冲液pH7.6洗涤一次，沉淀即为去UP—染色质。

2.NP——

方法一：HAP柱层析分离：

HAP采用Bennardi法制备。经漂选后装柱（1.5×8 cm），用洗脱液1（2 M NaCl—5 $M$尿素—1 m$M$磷酸钠缓冲液pH6.8）平衡过夜。样品（将去up—染色质加5倍洗脱液1于盐冰浴中经CSP—1 A超声波发生器（250瓦功率）处理1—1.5分钟）上柱，其上柱量为100$A_{280}$/毫升HAP。流速为20毫升/小时。经洗脱液1充分洗脱后，依次换用下列缓冲液进行分部洗脱：洗脱液2（2 M NaCl—5 $M$尿素—50m$M$磷酸钠缓冲液pH6.8）。洗脱液3（2 $M$ NaCl—5 M尿素—100m$M$磷酸钠缓冲液pH6.8）。洗

脱液 4（2 M NaCl—5 M尿素—200m$M$磷酸钠缓冲液pH6.8)。洗脱液 5（2 $M$ NaCl—5 $M$尿素—500m$M$磷酸钠缓冲液pH6.8）。

方法二：酚抽提按Liew法进行：

去UP—染色质[UC]加 2 倍0.25$M$ HCl，搅拌抽提20分钟，沉淀再重复抽提一次，把沉淀悬浮于一倍体积TEM溶液（0.1$M$ Tris—0.01$M$ EDTA 钠盐—0.1$M$巯基乙醇pH8.4），加一倍体积经TEM溶液饱和的重蒸酚，冷室搅拌过夜。次日离心分层，水层再加一倍体积酚经室温搅拌20分钟抽提一次，离心分层，合并 2 次酚液，置透析袋分步透析：透析 1 —用0.1$M$醋酸—0.14$M$巯基乙醇pH为2.94，约须1000毫升，室温透析 5—7 小时至酚体积减缩到五分之一或更小体积。透析 2 —用 9 $M$尿素—0.05$M$醋酸—0.14$M$巯基乙醇pH为4.36，约须2000毫升，置室温透析过夜。透析 3 —用8.6$M$尿素—0.01$M$ EDTA钠盐—0.14$M$ 巯基乙醇—0.1$M$ Tris・HCl缓冲液 pH8.4，约须2000毫升，置室温透析 3 小时。透析 4 —用 8 $M$尿素—20m$M$甘氨酸— 3 m$M$巯基乙醇—20m$M$ Tris・HCl缓冲液pH8.0，约须1000毫升，置室温透析过夜。经水透析后，再浓缩至 2—3 毫克/毫升，作电泳样品用。

6.化学组成（DNA・RNA・蛋白）之测定：

参照O'malkey法进行。测定样品有：纯核（先经0.1%SDS溶液破膜),经 1 %Triton×—100处理的核・染色质・up・去up—染色质[UC]以及HAP 柱层析各分部（须经水透析去盐）。DNA以小牛胸腺DNA作标准,按二苯胺法测定。RNA以酵母tRNA作标准，按Orcinol法测定。总蛋白以结晶牛血清白蛋白作标准，按Lowry法测定。

7.三种非核酶活力的测定：

1. 5 —核苷酸酶测定，按Michell法。

2.还原型辅酶 I 脱氢酶测定，按wallach法。

3.琥珀酸脱氢酶测定，按汪静英法。

8.电镜：

纯核经固定脱水后用Epon包埋、切片。用柠檬酸铅和铀醋酸双重染色，在Hu11型电子显微镜上观察。

9.核转录活力的测定：

按黄道培等的方法测定，结果另文发表。

10.双向丙烯酰胺凝胶电泳法：

参照O'Farrell法进行。

第一相为不连续pH梯度电泳——圆柱形凝胶管13×0.2cm。凝胶浓度为 5 %。两性载体电介质pH 3 —10为0.4%。pH 5 —7为1.6%。样品量为 1 毫克/管。电泳在冷室中进行。电泳按下述进行：200伏，15分钟。300伏，30分钟。400伏，12小时。500伏，1 小时。

第二相为SDS电泳——凝胶板大小为16.5×16.5cm，凝胶厚度为0.2cm。分离胶浓度为10%。浓缩胶浓度为 4 %。电泳在室温中进行。25毫安/胶板，电泳20分钟后电流调至20毫安/胶板。用0.1%考马斯亮兰$R_{250}$染色。

11.pH梯度测定：

参照Liew法。将第一相凝胶切成22小段（0.5cm/小段），分别浸于0.01M KCl溶液（用重蒸水配制的）中，浸放1小时后用PHS—2型酸度计（上海第二分析仪器厂产）测定之。

*12.标准蛋白分子量双向电泳图谱测定：*

方法按上述进行。标准蛋白为牛血清白蛋白，分子量为68000。细胞色素C，分子量为12000。胰岛素，分子量为5700。

## 结果与讨论

1.细胞核的纯化：

为了提高细胞核的产率，除了超离心时上层的蔗糖密度必须大于1.7*M*外，作者还对离心温度及离心方式进行试验，如表1所示。当离心转头与样品温度在4°C下达平衡后，收率可提高一倍，与文献报导相符。若离心时以速度梯级加速（13000×g 离心5分钟，加速到28000×g 离心5分钟，再加速到55000×g 离心50分钟）要比正常加速收率提高约14%。按本法制备的细胞核产率约为组织湿重的5%。

表1　不同超离心情况对大鼠肝细胞核产率的影响

| | 温度 | | 加速方式 | |
|---|---|---|---|---|
| 条件 | 转头与样品不平衡 | 转头与样品平衡 | 正常加速 | 速度梯级加速 |
| 产率%* | 2.2 | 4.5 | 4.3 | 4.9 |
| 倍数* | 1 | 2.05 | 1 | 1.14 |

* 三次实验平均数

*2.细胞核纯度鉴定：*

按本法制备的细胞核不仅纯度较好，产率较高并具有转录活力。表明核结构在纯化过程中未遭破坏。基纯度鉴定如下：（1）经相差显微镜观察，其中杂质较少（见图1）。（2）纯核用电镜观察，可见核膜上较少有内质网污染（见图2a）。经Triton×—100处理后就更显得干净了（见图2b）。（3）通过三种非核酶的活力测定（见表2）。即5'—核苷酸酶、还原型辅酶Ⅰ脱氢酶及琥珀酸脱氢酶。从上述这些酶测定结果证明了在纯化的细胞核中这些非核酶的活力大大降低了。

表2　大鼠肝纯核与肝匀浆的几种酶活力测定

| | 5—核苷酸酶 | 还原型辅酶Ⅰ脱氢酶 | 琥珀酸脱氢酶 |
|---|---|---|---|
| 纯核 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |
| 肝匀浆 | 1 | 1 | 1 |

（4）二种纯核的内源转录活力的测定（见表3）。由表3可见，纯核在25°C下保

温1小时后，内源转录活力较对照提高了10倍，且受放线菌素D所抑制。同时转录产物对RNAaseA是敏感的。

表3　　大鼠肝纯核转录活力的测定

| | 总脉冲数/分 | 参　入 | % |
|---|---|---|---|
| 零　分 | 3393 | | |
| 60　分 | 33805 | 30412 | 100 |
| 加RNAaseA | 4609 | 1216 | 4.0 |
| 加放线菌素D | 8837 | 5444 | 17.9 |

3.对核、用1%Triton X—100处理的核、染色质、UP，去UP—染色质（UC）作了DNA、RNA蛋白比率之测定，结果（见表4）如下：

表4　　大鼠肝细胞核染色质和其分部（UP UC）的化学组成

| | DNA | RNA | 蛋白 |
|---|---|---|---|
| 纯核 | 1 | 0.2 | 2.4 |
| 用1%TritonX—100处理纯核 | 1 | 0.1 | 2.6 |
| 染色质 | 1 | 0.1 | 2.5 |
| 结合疏松的非组蛋白(UP) | 1 | 0.7 | 6—14 |
| 去UP—染色质(UC) | 1 | 0.01 | 1.3—1.7 |

用1%TritonX—100处理的核，因除去了残留在核膜上的内质网，使RNA含量比未经TritonX—100处理为低。因此，用1%TritonX—100处理的核比未经TritonX—100处理的核纯，胞质污染更少。up中RNA含量较其它分部高，但DNA所占比例不高，因此可以直接用作双向凝胶电泳分析的样品。去UP—染色质（UC）除含有组蛋白（HP）、NP外还含有大量的DNA和微量的RNA。

4.去UP—染色（UC）质的HAP柱各分部的紫外吸收光谱及DNA、RNA、蛋白比率之测定：

从图4、5和表5中可见去UP—染色质(UC)经HAP柱分部得到5个洗脱峰。洗脱Ⅰ峰主要为HP，还含有微量的DNA和RNA。洗脱Ⅱ峰主要为NP，但含有不少DNA和微量RNA。洗脱Ⅲ峰除NP量增加外，还含有一些DNA和RNA。洗脱Ⅳ峰仍含有少量NP和RNA，主要组份为DNA。洗脱Ⅴ峰为DNA，蛋白量极微。从上述HAP各分部的化学组成测定与紫外吸收光谱测定结果是相一致的。由上可见用HAP柱分部制得的NP量少且含有DNA。本文采用酚抽提法能制得较多NP，且无DNA干扰，可作双向凝胶电泳分析用。

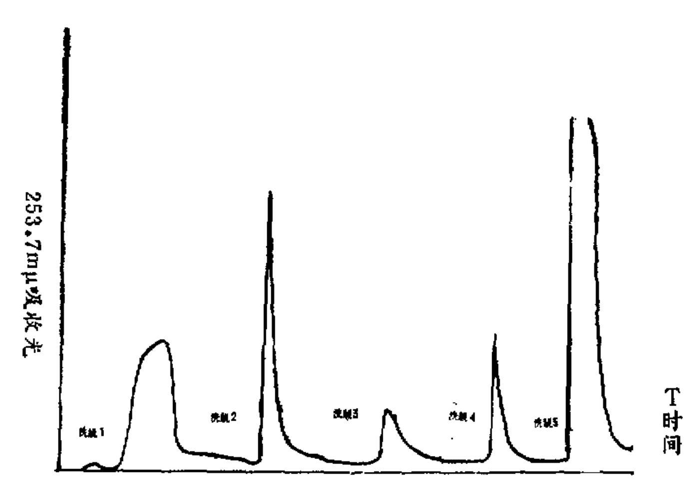



图4 大鼠肝UP—染色质（UC）的HAP层析

大鼠肝染色质UC的HAP柱层析在蛋白核酸检测仪上的自动描绘图谱

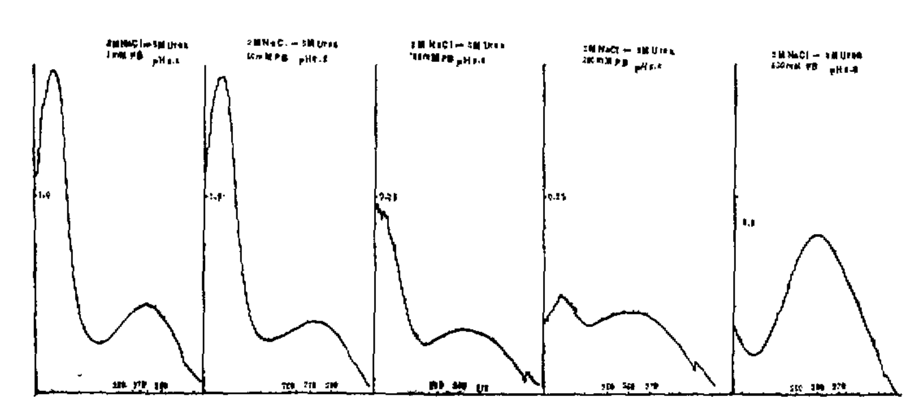


图5 大鼠肝去UP—染色质（UC）的HAP柱层析各分部的紫外吸收光谱

**表5 大鼠肝去UP—染色质（UC）从HAP柱洗脱分部的化学组成**

| | 洗脱液 | DNA | RNA | 蛋白 |
|---|---|---|---|---|
| 洗脱1. | 2 MNaCl/5 M urea/1 mM PB pH6.8 | 1 | 0.2 | 27.4 |
| 洗脱2. | 2 MNaCl/5 M urea/50mM PB pH6.8 | 1 | 0.2 | 0.5 |
| 洗脱3. | 2 MNaCl/5 M urea/100mM PB pH6.8 | 1 | 0.4 | 0.8 |
| 洗脱4. | 2 MNaCl/5 M urea/200mM PB pH6.8 | 1 | 0.1 | 0.2 |
| 洗脱5. | 2 MNaCl/5 M urea/500mM PB pH6.8 | 1 | 0.1 | 0.02 |

5.UP与NP的双向凝胶电泳图谱分析：

第一相等电点凝胶电泳其pH梯度为4.6—7.6（见图6）。标准蛋白分子量电泳图谱（见图7）。按本法制备的up与NP其分子量范围约在5700—68000之间。从电泳图谱观察，up与NP不但在蛋白含量上差异很大。据Chiu报道，UP占染色质蛋白44—47%，NP占染色质蛋白2—3%，与本实验室测定结果基本相符。而且其蛋白组份也大不相同，UP约有二百以上组份，NP约有一百个以上组份其中几十个组份能明显观察到的。UP与NP分子量主要集中在5700—68000之间，还有一些分子量在5700以下的。

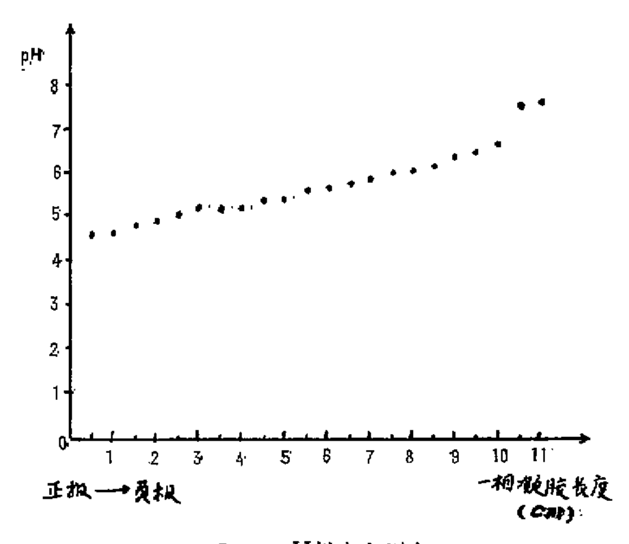



图6　pH梯度之测定

从上述观察结果，作者认为染色质非组蛋白还含有多种多肽，它们与基因表达究竟有何关系，有待进一步研究。

感谢沈昭文先生、沈菊英、程宜寿*、汪静英、唐海伦、庄熙孟等同志热情帮助。

* 江西医学院

## 参 考 文 献

汪静英、王应睐 1964 琥珀酸脱氢酶研究IV若干螯合剂对重组合的作用. 生物化学与生物物理学报 4 期 222页.

Bernardi, G. 1971. Methods in Enzymology. Vol. 21, Part. D, Academic Press, New York. p.95.

Burton, K. 1956 As study of the conditions and mechanism of diphenylamine reaction for colorimetric estimation of DNA. *B. J.* Vol. 62, p. 315.

Ceriotli, G. 1955 Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. B. C.* Vol. 214, p.59.

Chiu, J. F. et al. 1975 DNA-binding chromosomal non-histone proteins isolation. characterization and tissue specifity. *Biochemistry*. Vol. 14. p. 4552.

Chiu, J. F. et al. 1975 Regulation of vitro mRNA transciption by a fraction of chromosomal proteins. *J. B. C.* Vol. 250, p.9431.

Ernest, M. J. 1976 RNA synthesis in isolated hen oviduct nuclei. *Biochem.* Vol. 15, p. 824.

Fry, D. J. 1976 Isolation of nuclear envelopes from whole tissue in subnuclear compnents preparation and fractionation. edited by G. D. Birne. p. 68. Butterworth & Co Ltd.

Legraverend, M. and Glezer, R. J. 1980 Characterization of a non-histone chromosal protein which stimulates RNA polymerase I. *B. B. A.* Vol. 607, p. 92.

Liew, C. C. 1979 Nonhistone chromatin proteins chemistry fractionation and fringerprints by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Recent. Ade. Genetic. Res. Vol. 2.

Lowry, O. H. et al. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. B. C.* Vol. 193, p. 265.

Michell, R. H. and Hawthorne, J. N. 1965 The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commum.* Vol. 21, p. 333.

O'Farrell, P. H. 1975 High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. B. C.* Vol. 250, p. 4007.

O'malky, W. 1971 Progesterone-binding components of chick oviduct chromatin acceptor sites. *J. B. C.* Vol. 246, p.4188.

Pomerai, D. I. et al. 1974 Preparation of chromatin variation in the template properties of chromatin dependent on the method of preparation. Eur. *J. Biochem.* Vol. 46, p.461.

Suria, D. and Liew, C. C. 1974 Isolation and analysis of non-histone chromatin proteins from rat-liver nuclei by three different methods. Canadien. *J. Biochem.* Vol. 52, p. 1143.

Wallach, D. F. H. and Kamat, V. B. 1965 Preparation of plasmam-Membrane fragments from mouse ascites tumor cells. Methods in Enzymol. Vol. 8, p. 164.

# PURIFICATION OF NUCLEI AND FRACTIONATION OF CHROMATIN FROM RAT LIVER AND ELECTROPHORESIS OF NON-HISTONE CHROMATIN PROTEINS BY TWO DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS

Fan Jianying, Xu Yisheng, Wu Jun & Yang Ruikun

*(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)*

Li Baoque, Zhong Jinliang & Huang Daopei

*(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)*

Nuclei were prepared from adult rat liver by a slightly modified ultracentrifugation method, with a yield of about 5%. The quality of rat liver nuclei has been ascertained by observations with the phase contract microscope, electron microscope, transcriptional activity and estimations of enzyme activity. The chromatin of rat liver was fractionated by the method of hydroxyapatite (HAP) chromatography. The U. V. spectrum of each fraction was obtained individually. The chemical compositions of the nuclei, chromatin, Up ( a group of nonhistone proteins binding DNA loosly), deUp-chromatin and each fraction from HAP were determined. NP (a group of nonhistone proteins binding DNA tightly) were extracted from deUP-chromatin with phenol. UP and NP were analysed by two dimensional gel electrophoresis.

# 樊剑英等：大鼠肝细胞核纯化、染色质分部及染色质非组蛋白双向凝胶电泳分析

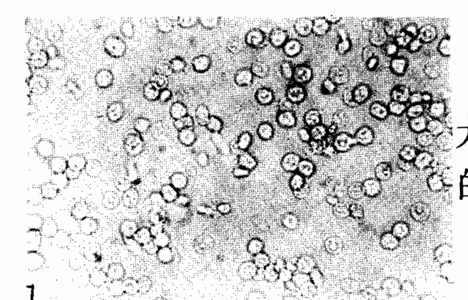


图1.纯化大鼠肝细胞核的相差显微镜图16×0.32

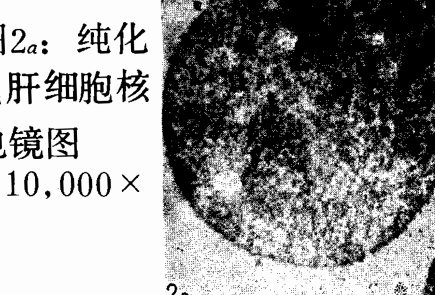


图2a：纯化大鼠肝细胞核的电镜图 10,000×

图2b：经1%Triton×—100处理纯化大鼠肝细胞核的电镜图 10,000×

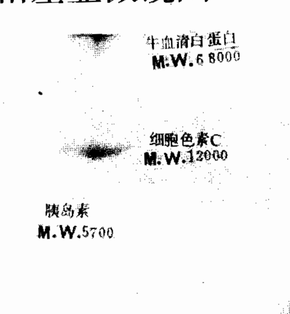
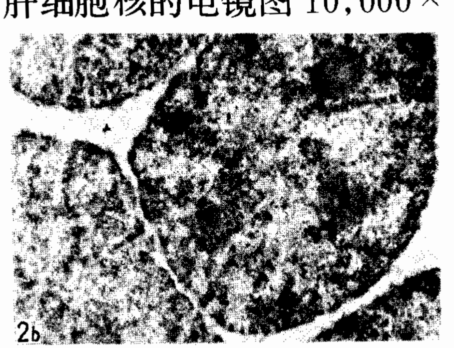


图7.标准蛋白分子量之双向电泳图谱




# 谢占泰等：三类抗蝮蛇毒血清的聚丙烯酰胺凝胶电泳比较研究

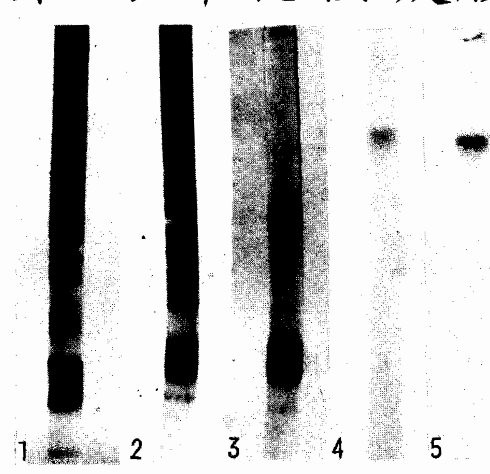


图1.聚丙烯酰胺凝胶电泳谱。

# 钟金颜：猕猴(*Macaca mulatta*)正常血清蛋白的电泳分析

150V



电压对血清蛋白分离效果的影响。